

## 明 細 書

## 自己免疫疾患治療剤

## 5 技術分野

本発明は、小胞体ストレスを誘導する物質を含む自己免疫疾患治療剤、特に関節リウマチ治療剤に関する。

## 背景技術

- 10 滑膜細胞は、関節リウマチにおいて顕著に増殖し、関節を破壊するための中軸的な役割を果たす細胞である。従って、関節リウマチを治療するために、滑膜細胞をターゲットとして、特にその細胞の自立的増殖の抑制を目標として多くの研究がなされてきた。しかしながら、その自立的増殖にかかわるメカニズムは十分に解明されていない。
- 15 本発明者は、リウマチにおける滑膜細胞の増殖をもたらす分子を探索する目的で抗滑膜抗体を用いた免疫スクリーニングを行なった結果、小胞体 (endoplasmic reticulum : ER) に存在するユビキチンリガーゼである「シノビオリン」 (Synoviolin) と呼ばれるタンパク質を単離し、それをコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。
- 20 興味深いことに、シノビオリン分子を強発現したマウスの約 30% は、滑膜細胞の増殖を伴う関節症を自然発症した。これに対し、シノビオリンの発現をヘテロノックアウトした  $\text{syno}^{+/-}$  マウスは、関節リウマチのモデルである 2 型コラーゲン誘導関節炎に対して抵抗性を示した。そして、この抵抗性が滑膜細胞のアポトーシス亢進に起因することを見出した。
- 25 これらの結果から、本発明者は小胞体ストレスに関与する ER-associated degradation (ERAD) 機能の亢進が滑膜細胞増殖をトリガーし、関節症をきたしうるというモデルを提唱した。

シノビオリンは、RING フィンガードメインを有するユビキチンリガーゼ (E3) であり、小胞体における品質管理を担う機能を有する。そのような小

- 胞体の品質管理を担うために、小胞体に生じた不良タンパク質を分解し、ER ストレス（後述）を軽減させる ERAD と呼ばれる機構が知られている。この ERAD について詳述すると以下の通りである。タンパク質は、細胞質で合成された後、正しい立体構造を形成して所定の場所に運ばれて初めて機能することができる。適切な高次構造がとれなかった不良又は損傷タンパク質は、細胞のもつ品質管理機能によりチェックを受けて、再生又は分解されて、細胞機能の恒常性を保つ。

- 小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス（例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等）に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス（ER ストレス）と呼び、小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質(unfolded protein)の出現頻度を上昇させる。立体構造に異常を来した不良タンパク質は小胞体を出てゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質が蓄積されてしまう。そこで、これらの ER ストレスに対して、細胞は UPR 及び ERAD と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質を分解し、そのような不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐのである。

本発明者は、このような ERAD 機能に着目し、シノビオリン依存性の ERAD 機能を抑制することが関節症の治療につながることを実証した。

- しかしながら、この疾患モデルはヒトの関節リウマチにも当てはまるとは限らず、Synoviolin の発現阻害がヒトの関節リウマチの治療に有効であるかは明らかでない。

#### 発明の開示

- 本発明は、自己免疫疾患、特に関節リウマチを治療するために有用な薬剤を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行なった結果、小胞体ストレスを誘導する物質に着目し、当該物質を用いると関節リウマチを治療し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、アポトーシス誘導剤。

小胞体ストレスを誘導する物質としては、例えばツニカマイシン、タブシ  
5 ガルギン及びブレフェルディン A からなる群から選択される少なくとも 1 つ  
が挙げられる。また、本発明の誘導剤には、シノビオリンをコードする遺伝  
子に対する siRNA をさらに含めることができる。

(2) 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、自己免疫疾患治療剤。

小胞体ストレスを誘導する物質としては、例えばツニカマイシン、タブシ  
10 ガルギン及びブレフェルディン A からなる群から選択される少なくとも 1 つ  
が挙げられる。本発明の治療剤は、関節リウマチなどを対象とする。上記治  
療剤には、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA をさらに含めて  
もよい。

(3) 細胞を、上記(1)に記載の誘導剤で処理することを特徴とする細胞の増殖抑  
制方法。細胞としては、例えば滑膜細胞が挙げられる。

15

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、関節リウマチ及び変形性関節症の滑膜におけるシノビオリンの発  
現を示す写真である。

図 2 は、RA 滑膜細胞におけるシノビオリンの発現亢進を示すウェスタン  
20 プロットの写真である。

図 3 A は、siRNA で処理した滑膜細胞で Synoviolin の発現を抑制すると、  
その増殖活性が低下することを示す図である。

図 3 B は、ツニカマイシンを用いたアポトーシス誘導、及びシノビオリン  
に対する siRNA を用いたアポトーシス誘導の増強を示す図である。

25 図 4 は、リウマチ滑膜細胞が他の細胞に比べ小胞体ストレス誘導性アポト  
ーシスに抵抗性を示すグラフである。

図 5 は、リウマチ滑膜細胞が変形性関節症滑膜細胞に比べ小胞体ストレス  
の刺激に対して抵抗性であることを示すグラフである。

図 6 は、コラーゲン誘導関節炎における小胞体ストレスを示す写真である。

コラーゲン誘導関節炎マウスの膝関節における ATF6 の発現。左の図はシノビオリン野生型、右の図は、シノビオリンヘテロ欠損型。

図 7 は、関節リウマチ滑膜組織における小胞体ストレスを示す写真である。

5 関節リウマチ滑膜組織における ATF6 の発現。左の図は、抗 ATF6 抗体による組織免疫染色。右の図は、ネガティブコントロール。上：倍率 x100 倍。下：倍率 x200 倍。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

## 10 1. 概要

前述の通り、ER ストレス存在下でも、ERAD 機能により滑膜細胞が増殖する。

15 しかし、ERAD の処理能力にも限界があり、その限界を超えてさらに ER ストレスを付与すると ERAD の機能はもはや果たすことができなくなる。本発明はこの点に着目し、ER ストレスを誘導させることによって、好ましくは ERAD の処理能力を超えるように過剰に ER ストレスを誘導させることによって、ERAD→滑膜細胞増殖→関節症という発症プロセスとは異なるプロセス（関節症の発症とは逆である関節症の抑制）を引き起こすことに成功したものである。

20 従って、本発明は ER ストレスを誘導させることにより、ERAD の機能を抑えて細胞にアポトーシスを誘導することを特徴とする。例えば、滑膜細胞にアポトーシスを誘導してその増殖を抑制し、ひいては関節症の治療を行なうことを特徴とする。

25 ここで、アポトーシスとは、細胞自らが引き起こす細胞死を意味し、細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表面微絨毛の消失、細胞質の凝集、カスパースの活性化、ミトコンドリア膜電位の消失、等の特徴とする。細胞に上記特徴が生じたときに、アポトーシスが誘導されたもの、すなわちアポトーシスが引き起こされたと判断する。

## 2. ER ストレス誘導物質

ER ストレスを誘導するために使用される物質は、一般に、小胞体におけるタンパク質の3次元構造を形成するために必要なシャペロンタンパク質の機能を阻害する物質を選択すればよい。ER ストレスが誘導されたか否かは、

- 5 以下の通り確認することができる。すなわち、小胞体に局在している転写因子 (ATF6: activating transcription factor 6) の活性化、小胞体に局在しているリン酸化酵素 (protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)) の活性化、小胞体に局在する特異的カススペース (カススペース 12) の活性化である。

- 10 活性化の測定は、ELISA 法、ウェスタンブロット法や蛍光免疫染色法をすることにより行なう。その結果、転写因子、リン酸化酵素やカススペースの活性化を起こすものを ER ストレス誘導物質として選択することができる。

- 本発明においては、ER ストレス誘導物質として、ツニカマイシン、タブシガルギン、プレフェルディン A、2-メルカプトエタノールなどを使用することができ、例えばツニカマイシン、タブシガルギン、プレフェルディン A が好ましい。ツニカマイシンは、ニューカッスルウイルスに対する抗ウイルス作用をマーカーとして発見された抗生物質であり、 $\beta$ -ガラクトサミンと  $\alpha$ -ガラクトサミンの組み合わせに炭素鎖 13 から 17 の脂肪酸が結合した物質の総称である。その機能は、動物細胞の N-グリコシド型糖鎖合成を選択的に阻害するというものである。上記 ER ストレス誘導物質は、合成することにより得ることができ、あるいはシグマ社などから購入することも可能である。

タブシガルギンは、ER 膜のカルシウムポンプ阻害作用を介して、ER 内のシャペロン分子の機能を抑制することにより、ER におけるタンパク質阻害、さらには、ER ストレス誘導物質として利用できる。

- 25 プレフェルディン A は、細胞内タンパク質輸送、即ち、ゴルジ体輸送を抑制する薬剤として知られており、1~10  $\mu$ g/ml の濃度で、分泌タンパク質の輸送を抑制し ER ストレスを誘導できる。

これらの ER ストレス誘導物質を用いてアポトーシスを引き起こすための用量は、in vitro の場合は 1  $\mu$ g/ml~50 mg/ml、好ましくは 1  $\mu$ g/ml~30mg/ml

である。あるいは、細胞あたり 1  $\mu$ g/ml~100 mg/ml、好ましくは 1  $\mu$ g/ml~50 mg/ml である。ER ストレス誘導物質をヒトに投与する場合は、後述の治療剤と同様の用法及び用量を採用することができる。

### 5 3. RNAi の利用

さらに、本発明においては、上記 ER ストレス誘導物質のほかに、シノビオリンをコードする遺伝子（「Synoviolin 遺伝子」ともいう）の発現を抑制するために RNAi(RNA interference)を利用することができる。RNAi とは、二本鎖 RNA を細胞内に導入すると、その RNA と相同配列の遺伝子の発現が抑制される現象である。

Synoviolin 遺伝子の発現を抑制するには、RNAi を起こさせるために、例えば Synoviolin 遺伝子に対する siRNA(small interfering RNA)を設計及び合成し、これを作用させればよい。

siRNA の設計基準は、以下の通りである。

- 15 (a) シノビオリンをコードする遺伝子の開始コドンの 100 ヌクレオチド下流の領域を選択する。

(b) 選択した領域から、AA で始まる連続する 15~30 塩基、好ましくは 19 塩基の配列を探し、その配列の GC 含量が 30~70%、好ましくは 45~55% となるものを選択する。

- 20 具体的には、以下の塩基配列を有するものを siRNA として使用することができる。

センス鎖： CGUCCUGGUACGCCGUCAUU（配列番号 1）

アンチセンス鎖： UGACGGCGUACCAGGAACGUU（配列番号 2）

- 25 siRNA を細胞に導入するには、in vitro で合成した siRNA をプラスミド DNA に連結してこれを細胞に導入する方法、2 本の RNA をアニールする方法などを採用することができる。

### 4. 用法、用量

本発明の ER ストレス誘導物質を有効成分として含有する治療剤は、自己

免疫疾患を対象とすることができる。なお、自己免疫疾患とは、自分自身の組織に対する免疫反応によって引き起こされる疾患をいい、関節リウマチ、橋本病（慢性甲状腺炎）、悪性貧血、アジソン病、糖尿病、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、エリテマトーデス、多発性硬化症、

- 5 重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病などがある。本発明の治療剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。

投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、一回につき体重 1kg あたり  $0.1 \mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ 、好ましくは  $1 \sim 10 \mu\text{g}$  である。但し、上記治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

- 本発明の治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容される担体や添加物を含むものであってもよい。このような担体及び添加物として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、
- 15 20
- メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

- 25 上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された ER ストレス誘導物質を溶剤(例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等)に溶解し、これに Tween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形

とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

5 siRNA を混合する場合の用量は、0.01～10  $\mu$ g/ml、好ましくは 0.1～1  $\mu$ g/ml である。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 〔実施例 1〕

10 本実施例においては、関節リウマチでは滑膜組織における Synoviolin の発現が亢進されるかを確認するために、関節リウマチ患者 10 人、変形性関節症患者 5 人の滑膜組織を対象として、Synoviolin に対するモノクローナル抗体による免疫染色の手法を用いて検討した。

その手法は以下の通りである。

15 パラホルムアルデヒド固定した組織をパラフィン包埋し、4 マイクロメートルの厚さに薄切し、プレパラートに固着させた。固着した切片からキシレンを用いてパラフィンを取り除き、3 %の過酸化水素水を混じたメタノールに室温で浸透し、内在性ペルオキシダーゼの失活化を行った。リン酸緩衝液によって洗浄した後、ベクスタチン社の VECTASTAIN (登録商標) ABC (ペ  
20 ルオキシダーゼ) キットに含まれるブロッキング試薬によって非特異的反応を阻害し、リン酸緩衝液によって 1  $\mu$ g/ml に希釈した抗 Synoviolin モノクローナル抗体を切片と室温で 1 時間反応させた。その後、VECTASTAIN (登録商標) ABC (ペルオキシダーゼ) キットに含まれるペルオキシダーゼ複合  
25 体と室温で説明書どおりに反応させ、シグマ社の DAB 基質を用いて室温 10 分間の発色を行った。対比染色としてメチルグリーンで核染色を行い、染色を完成させた。

ウェスタンブロッティングは、培養滑膜細胞 30 万個を 60mm 培養ディッシュに播種し、24 時間後に 50mM Tris base、150mM NaCl、0.1% SDS、1%、1  $\mu$ g/ml PMSF を含むタンパク質抽出バッファーによってタンパク質を抽出



した。これに SDS サンプルバッファーを加え、100℃5 分間の変性後に、10%  
アクリルアミドゲルによって分離した。分離したタンパク質を、ニトロセル  
ロースメンブレンに 250mA の電流によって 2 時間トランスファーした。メ  
ンブレンは、5 % のスキムミルクを混じた TBST によって室温 1 時間ブロッ  
5 キングを行った。0.5 % のスキムミルクを混じた TBST を用いて 0.1  $\mu$ g/ml に  
希釈した抗 Synoviolin を用いて、このメンブレンについて抗原抗体反応を室  
温で 1 時間行った。TBST によって洗浄した後、二次抗体である抗マウス HRP  
抗体と反応させ、化学蛍光発色によって検出した。

その結果、関節リウマチ滑膜では変形性関節症の滑膜に比べて滑膜細胞に  
10 おける Synoviolin の発現が極めて亢進していること (図 1)、すなわち  
Synoviolin 依存性の ERAD 亢進の存在が証明された。図 1 において、関節リ  
ウマチ滑膜組織 (RA:上段) では、変形性関節症滑膜組織 (OA:下段) に比  
べて Synoviolin の強発現が認められる。RA 滑膜細胞における Synoviolin の  
発現亢進は、培養細胞を用いたウエスタンブロッティングでも確認された (図  
15 2)。

## [実施例 2]

実施例 1 において、関節リウマチ滑膜では滑膜細胞における Synoviolin の  
発現が極めて亢進していることを示した。しかし、関節リウマチにおいて亢  
20 進している Synoviolin 依存性の ERAD 機能を抑制することで、ヒト関節リ  
ウマチの滑膜細胞の増殖を抑制することができるか否かについては明らかで  
はない。

そこで、ER ストレスを誘導することによるアポトーシスを、ER 誘導剤で  
あるツニカマイシン (tunicamycin) を用いて検討した。その際、Synoviolin  
25 遺伝子 に対する small interfering RNA (siRNA) を処理した滑膜細胞を用いた  
検討も行なった。

すなわち、siRNA を処理することによって、関節リウマチ滑膜で発現が亢  
進している Synoviolin を人為的に抑制し、滑膜細胞の不活性化およびアポト  
ーシス誘導が可能であることを確認する事を試みた。

実験は以下のように行なった。すなわち、リウマチ滑膜細胞をFalcon社の96穴平底プレートに160個ずつ播種し、24時間後SynoviolinおよびGFPに対するsiRNAを処理し、さらに96時間後に増殖活性を検討した。この場合、GFPは陰性コントロールとして使用している。細胞の増殖の程度は同仁化学研究所の

5 WST-8 assayを用いて測定した。リウマチ滑膜細胞におけるSynoviolinの発現をsiRNAによって抑制することで、その増殖活性はGFPを100とした場合の約6割に低下していることが判明した（図3A）。

次に、Nunc社の8 well Lab-tek chamberに2500個の滑膜細胞を播種し、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて24時間培養後、67nMのsiRNA

10 をMiru社のトランスフェクション試薬TransIT-TKOを用いて滑膜細胞に導入した。さらに、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて48時間培養後に、ツニカマイシン50μg/mlを添加し、同様に48時間培養した。その後細胞を固定し、Hoechst33258によってDNA染色を行い、核の凝集を確認した。

その結果、滑膜細胞において、ツニカマイシンによるアポトーシス誘導が

15 起こり、さらにsiRNAを併用することにより、アポトーシスの誘導が増強された（図3B）。

以上の結果は、本発明者がマウスモデルを用いて証明した関節症発症のモデル、すなわちSynoviolin依存性のERAD亢進は滑膜細胞のアポトーシス回避による増殖を介して関節症をトリガーし、反対にSynoviolin阻害によってアポトーシスを引き起こすことで滑膜増殖が抑制できることが、ヒト滑膜

20 細胞においても当てはまることを示している。

ヒトの関節リウマチ滑膜が小胞体ストレスに抵抗性であり、かつ、そのシグナルを活性化することにより滑膜細胞の増殖抑制、さらにアポトーシスの誘導が可能である。

25

### 〔実施例3〕

本実施例では、滑膜細胞、特にリウマチ滑膜細胞が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに抵抗性があるか否かについて、リウマチ滑膜細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスを、ERストレス誘導剤を用いて検討した。

実験は以下のように行った。すなわち、リウマチ滑膜細胞、変形性関節症滑膜細胞と、HeLa細胞, HEK293細胞をFalcon社の96 穴平底プレートに3000個ずつ播種し、24時間後小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (10 or 100  $\mu$  g/ml), タブシガルギン (1 or 10  $\mu$  M), プレフェルディンA(10 or 100  $\mu$  g/ml) で48 時間処理することにより、小胞体ストレス誘導性アポトーシスを誘導した。各々の細胞のアポトーシス誘導の程度はChemicon社のssDNA apoptosis ELISA kitを用いて測定した。滑膜細胞、特にリウマチ滑膜細胞は小胞体誘導性アポトーシスに対して抵抗性があることが示された (図 4)。

#### 10 [実施例 4]

本実施例では、リウマチ滑膜細胞が小胞体ストレスの刺激に対して抵抗性を有するか否かについて、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを用いて検討した。

- 実験は、以下のように行った。すなわち、リウマチ滑膜細胞 (RA: 5症例) および対象として変形性関節症滑膜細胞 (OA: 5症例) を小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン で24時間処理し、ヒトのリウマチ滑膜細胞は小胞体ストレスに対して抵抗性があるのかを検討した。ツニカマイシン は10, 30, 100  $\mu$  g/mlの濃度を用いて、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを誘導した。アポトーシスはCemicon社のssDNA apoptosis ELISA kitを用いて定量した。
- 20 結果として、リウマチ滑膜細胞は変形性関節症滑膜細胞と比較して小胞体ストレス誘導性のアポトーシスに対して抵抗性であることが分かった。(10  $\mu$  g/ml: RA $0.73 \pm 0.30$ , OA  $2.18 \pm 1.19$ , 30  $\mu$  g/ml: RA  $0.84 \pm 0.35$ , OA  $2.76 \pm 1.84$ , 100  $\mu$  g/ml: RA  $0.81 \pm 0.28$ , OA  $3.65 \pm 2.53$ ) (図 5)。

#### 25 [実施例 5]

本実施例では、コラーゲン誘導関節炎において小胞体ストレスが存在するか否かについて、コラーゲン誘導関節炎を起こしたシノビオリン野生型および欠損型のマウスの膝関節を用いて、検討した。

すなわち、コラーゲン誘導関節炎を起こしたシノビオリン野生型および欠損

型のマウスの膝関節における免疫組織染色により、ATF6の発現の有無を確認した。

実験は以下のように行った。すなわち、コラーゲン誘導関節炎を起したシノビオリン野生型およびヘテロ欠損型のマウスの膝関節を採取した。4 %パラホルムアルデヒド溶液で4時間固定後、パラフィン包埋したものを4マイクロメートルの厚さに薄切し、プレパラート上に固定した。そして脱パラフィン作業を行った後、小胞体ストレス存在下で細胞核に集積するATF6(activating transcriptional factor 6)の発現を検討した。抗ATF6 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz社) および正常ヤギIgG (Dako社) をおのおの0.001mg/mlの濃度  
5  
10  
で反応させ、Vector社のvectastain kitおよびジアミノベンジジン発色系を用いた免疫組織染色を行った。

図6に矢印で示したように、コラーゲン誘導関節炎によって、ATF6の細胞核への集積、すなわち小胞体ストレスが出現することが明らかとなった。またこの現象はシノビオリン欠損型マウスで顕著であることから、シノビオリンは  
15  
関節炎によって惹起される小胞体ストレスを阻害する機能を有することが明らかとなった(図6)。

#### 〔実施例6〕

実施例5において、シノビオリンは関節炎によって惹起される小胞体ストレスを阻害する機能を有することを示した。また、ERADの亢進が滑膜細胞の増殖に  
20  
関与することが、マウスを用いた研究により明らかとなった。しかし、ヒトの関節リウマチ滑膜組織においても、ERADの亢進が滑膜細胞の増殖にとって有効なメカニズムとして働きうるのかは明らかではない。

そこで、ヒトの関節リウマチ滑膜組織においても、ERADの亢進が滑膜細胞  
25  
の増殖にとって有効なメカニズムとして働きうるのかを検討する目的で、ヒトの関節リウマチ滑膜組織における小胞体ストレスの存在を確認した。小胞体ストレスの存在が証明できれば、これを回避する機能としてのERADの亢進は、関節リウマチの滑膜細胞の増殖に関して重要な意味を有するからである。

実験は以下のように行った。すなわち、ヒト滑膜組織は関節リウマチ患者の

膝関節置換術時に切除されたものを、文書による承諾を得られた後に採取した。4%パラホルムアルデヒド溶液で4時間固定後、パラフィン包埋したものを4マイクロメートルの厚さに薄切し、プレパラート上に固定した。脱パラフィン作業を行った後、小胞体ストレス存在下で細胞核に集積するATF6(activating transcriptional factor 6)の発現を検討した。抗ATF6 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz社) および正常ヤギIgG (Dako社) をおのおの0.001mg/mlの濃度で反応させ、Vector社のvectastain kit およびジアミノベンジジン発色系を用いた免疫組織染色を行った。その結果、図7の矢印に示されるように、関節リウマチ滑膜組織において、ATF6の細胞核への集積がみられた。これにより、小胞体ストレスの存在が明らかとなった(図7)。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、自己免疫疾患治療剤が提供される。本発明の治療剤は、例えば関節リウマチの治療薬として有用である。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号1：合成RNA

配列番号2：合成RNA

## 請求の範囲

1. 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、アポトーシス誘導剤。
2. 小胞体ストレスを誘導する物質がツニカマイシン、タプシガルギン及び
- 5     ブレフェルدين A からなる群から選択される少なくとも1つである請求項1記載の誘導剤。
3. シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA をさらに含む、請求項1又は2記載の誘導剤。
4. 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、自己免疫疾患治療剤。
- 10   5. 小胞体ストレスを誘導する物質がツニカマイシン、タプシガルギン及びブレフェルディン A からなる群から選択される少なくとも1つである請求項4記載の治療剤。
6. 自己免疫疾患が関節リウマチである請求項4記載の治療剤。
7. シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA をさらに含む、請求項
- 15   4～6のいずれか1項に記載の治療剤。
8. 細胞を、請求項1～3のいずれか1項に記載の誘導剤で処理することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。
9. 細胞が滑膜細胞である請求項8記載の方法。

図1

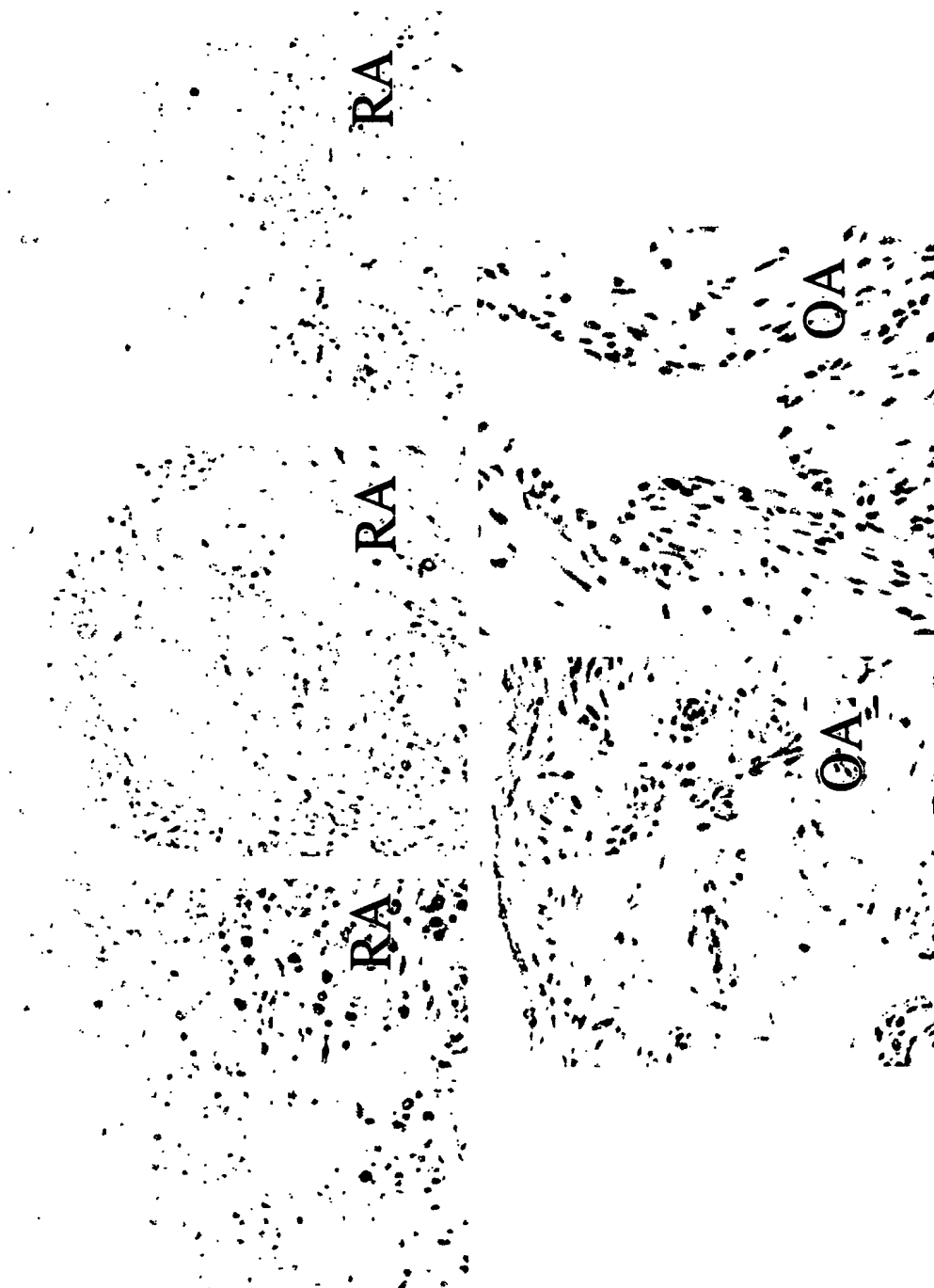


図2

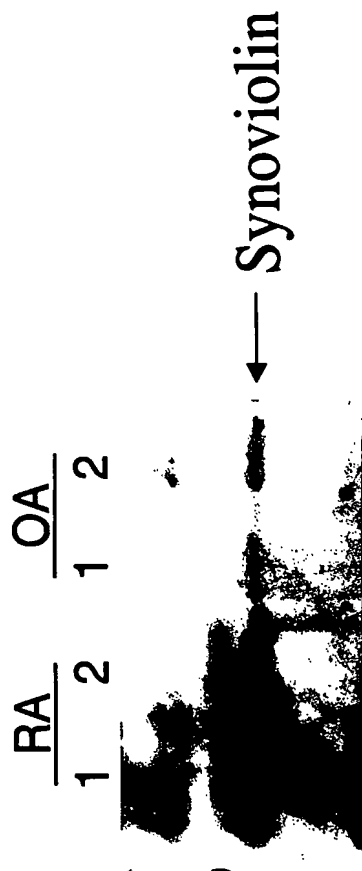




図3A

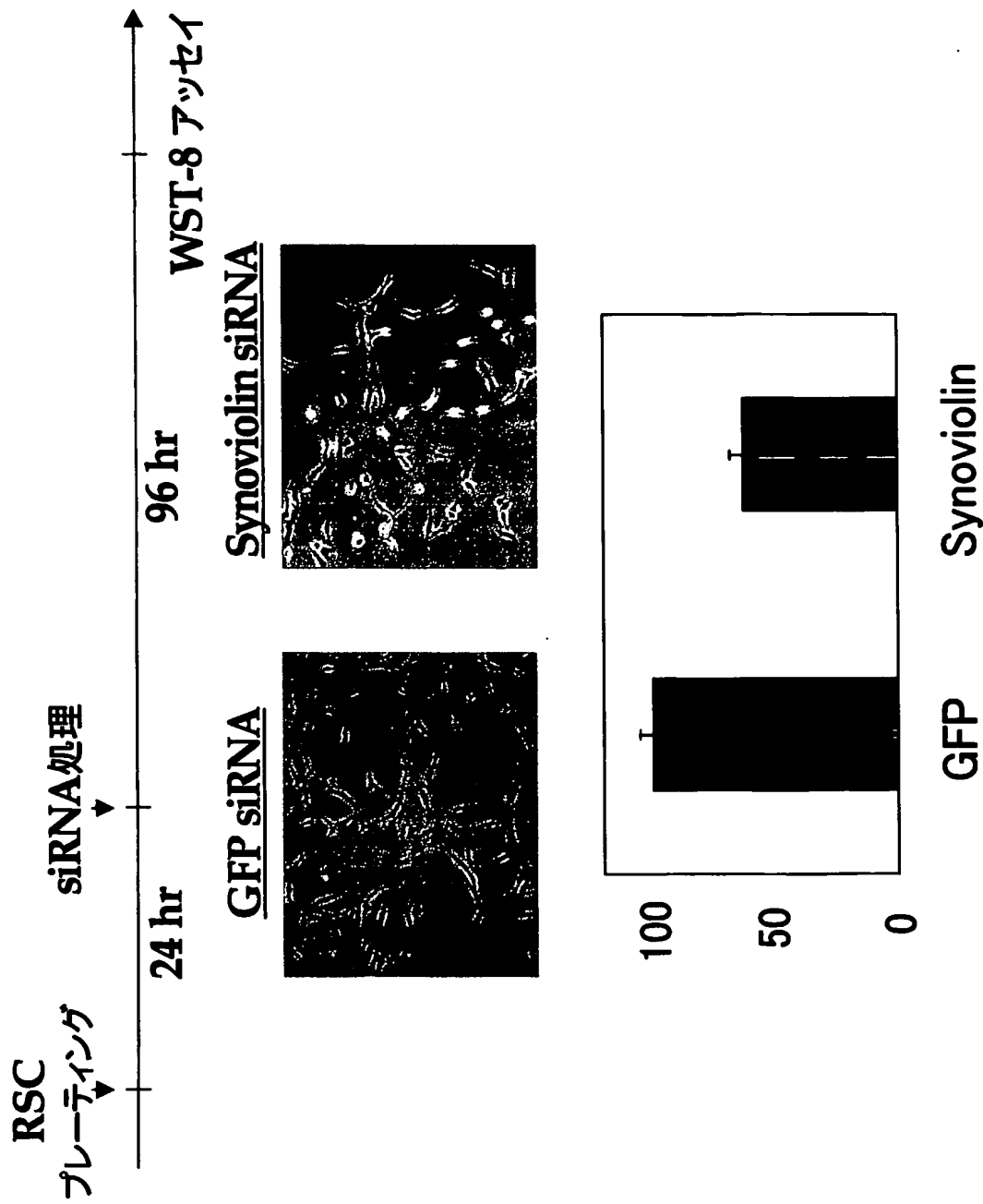


図3B

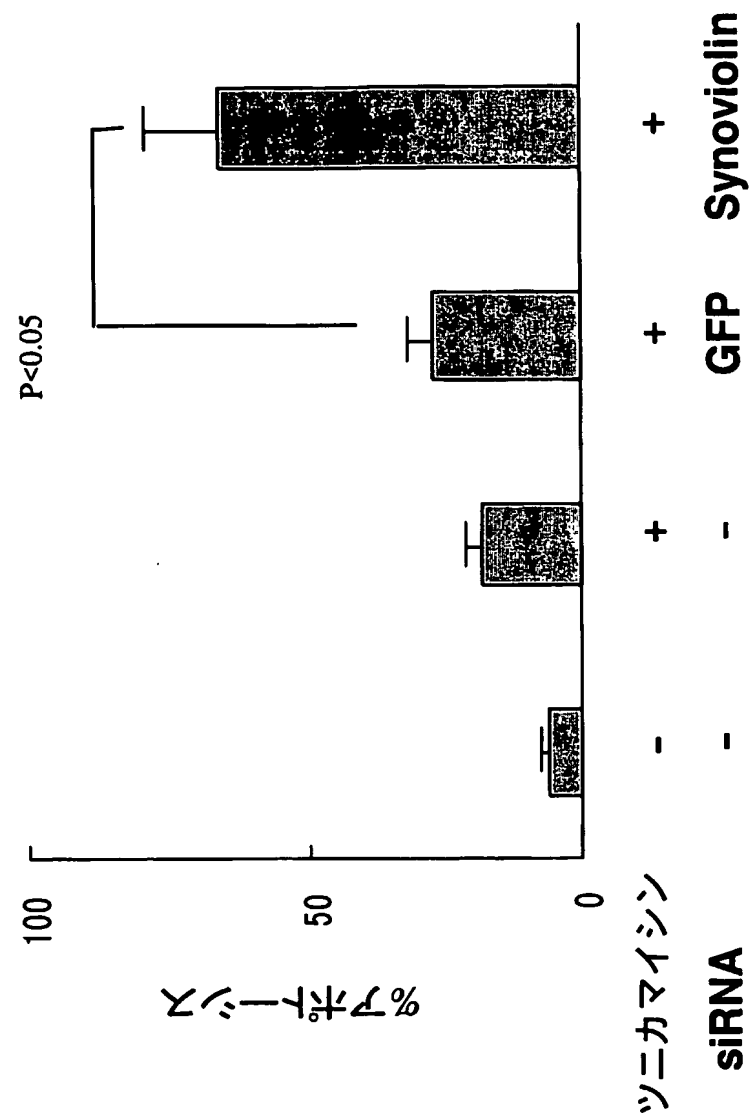


図4

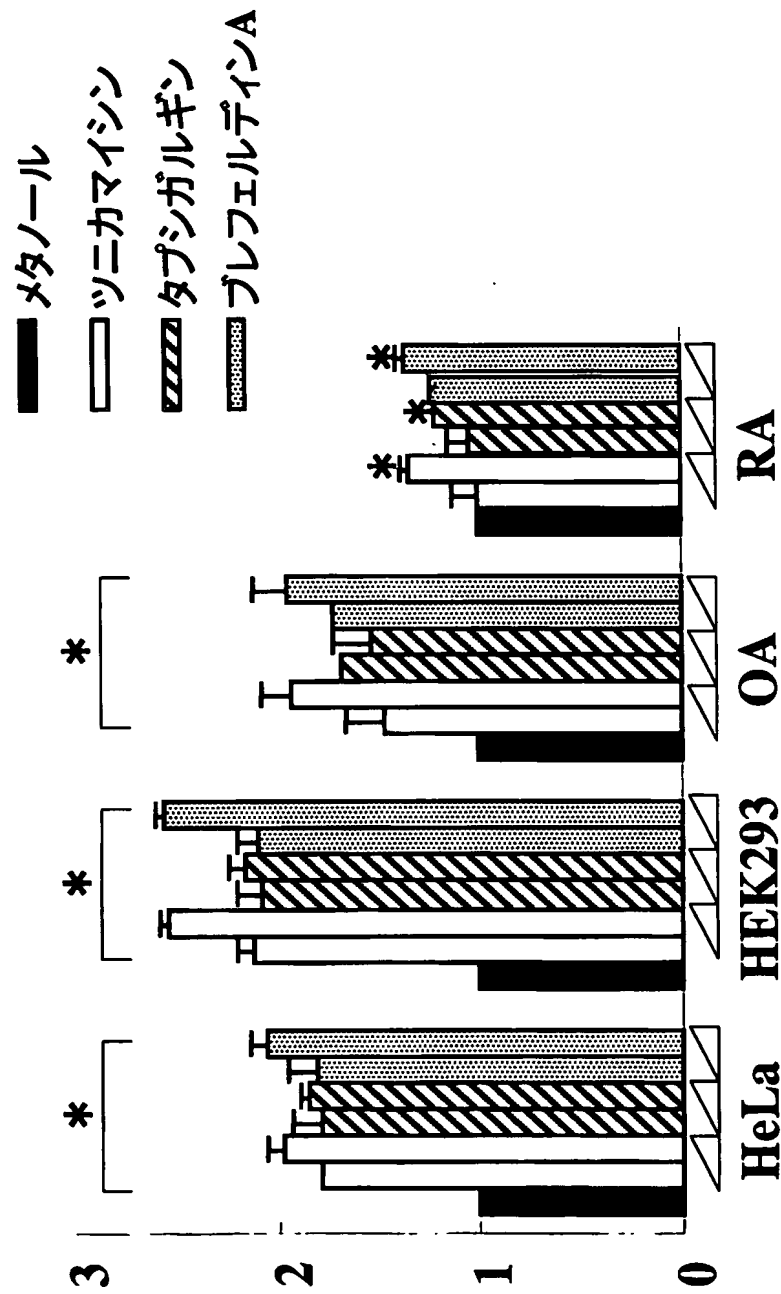


図5

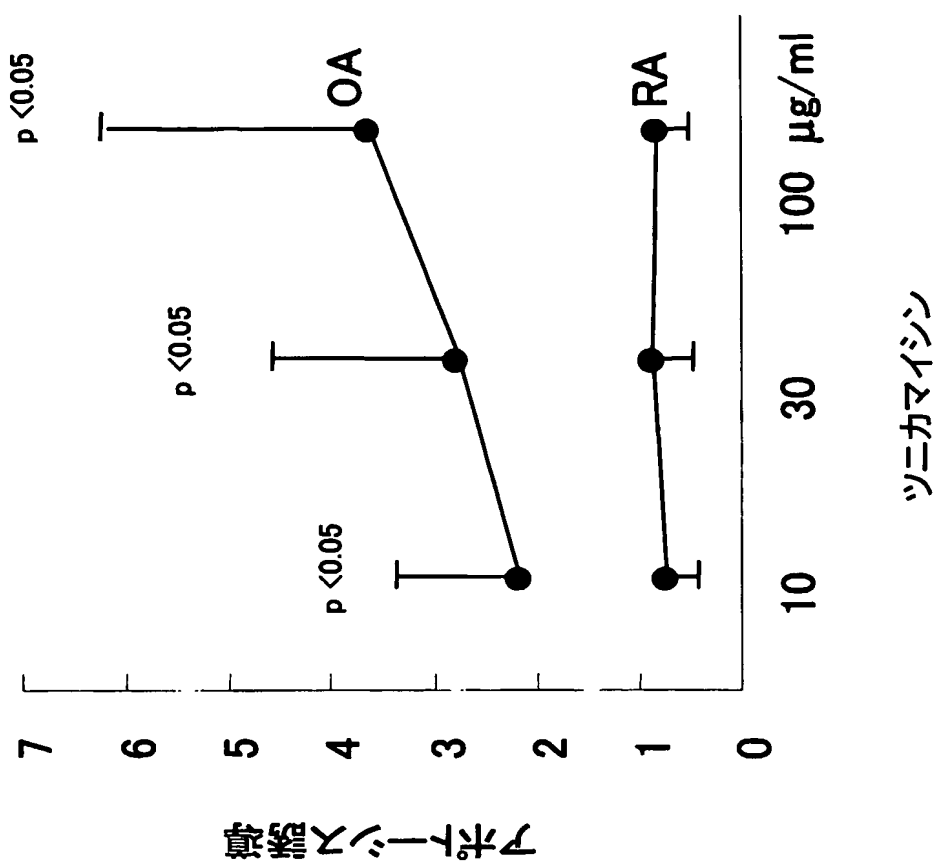
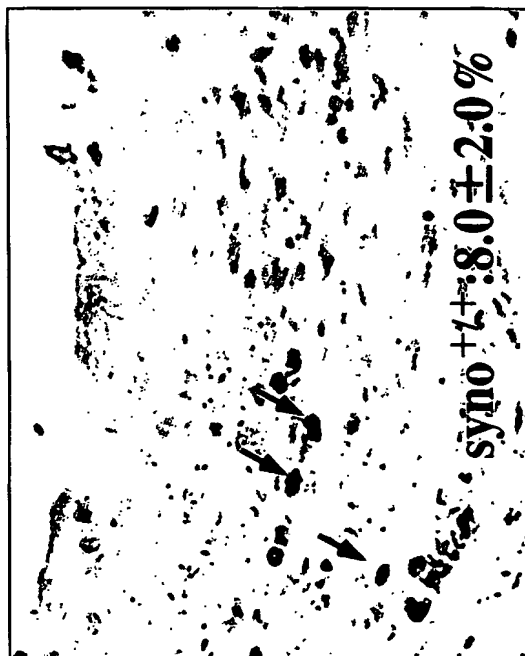
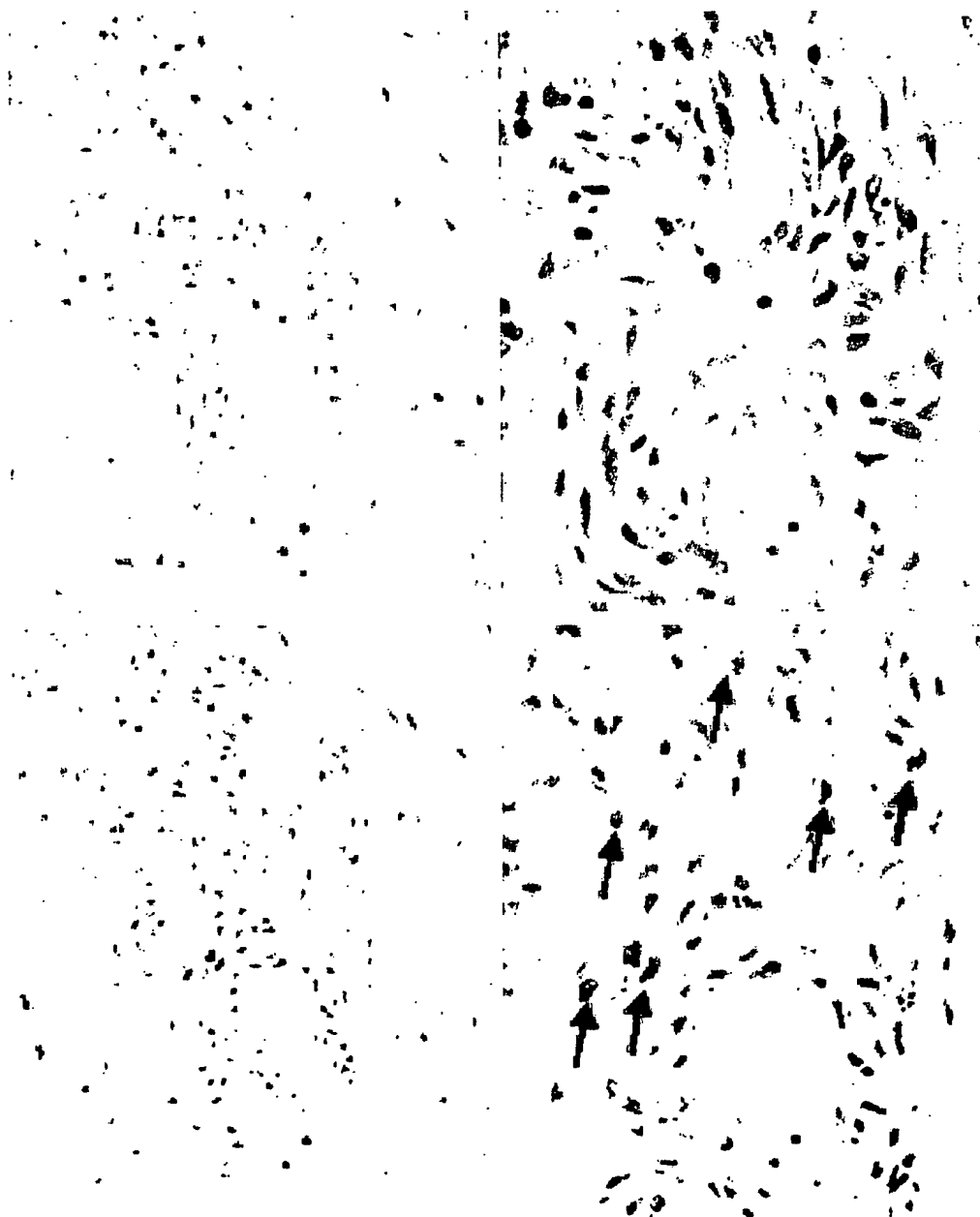


図6



7



## SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> A therapeutic agent of autoimmune disease

<130> P03-0116PCT

<150> JP2003-297742

<151> 2003-08-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic RNA

<400> 1

cguuccuggu acgccgucau u

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic RNA

<400> 2

ugacggcgua ccaggaacgu u

21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012422

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7072, 31/335, 31/343, 48/00, 31/7105, A61P29/00, 37/06, 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7072, 31/335, 31/343, 48/00, 31/7105, A61P29/00, 37/06, 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yasukazu KATAYAMA et al., 'Shohotai Stress to Apoptosis', Experimental Medicine, 2001, 19(13): 1695-1702	1, 2 3-7
Y	Hiroyuki HAGIYAMA et al., 'Kansetsu Rheumatism to Apoptosis', Igaku no Ayumi, 07 June, 2003 (07.06.03), 205(10):763-767	4-7
Y	WO 02/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), Page 30, lines 8 to 16 & EP 1352961 A1	7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 September, 2004 (14.09.04)

Date of mailing of the international search report  
05 October, 2004 (05.10.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/012422

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kaneko M et al., 'Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation.', FEBS Lett. 04 December, 2002 (04.12.02); 532(1-2):147-52.	3,7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/012422

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/012422

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8, 9  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 8 and 9 involve methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## &lt;Subject of search&gt;

(1) The "substance capable of inducing endoplasmic reticulum stress" recited in claims 1, 3, 4, 6 and 7 covers all compounds having such a property. However, it appears that only some of the claimed compounds (in particular, tunicamycin, tapsigargin and brefeldin A recited in claims 2 and 5) are disclosed within the meaning of PCT Article 5, and hence that the support by the disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is lacked.

(2) The "therapeutic agent for autoimmune disease" recited in claims 4, 5 and 7 covers all types of therapeutic agents for autoimmune diseases. However, only the agent for articular rheumatism recited in claim 6 is concretely disclosed within the meaning of PCT Article 5. Taking into account that the disclosure of the description of this application relates particularly to inhibition of the proliferation of synovial cells, it appears that the support by the disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is lacked with respect to the treatment of other autoimmune diseases.

Therefore, search has been conducted on the following scope:

(with respect to claims 1-3)

- relationship between induction of endoplasmic reticulum stress and induction of apoptosis, and
- apoptosis inducing agent comprising tunicamycin, tapsigargin or brefeldin A recited in claim 2.

(with respect to claims 4-7)

- relationship between induction of endoplasmic reticulum stress and treatment of articular rheumatism, and
- therapeutic agent for articular rheumatism comprising tunicamycin, tapsigargin or brefeldin A recited in claim 5.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7072, 31/335, 31/343, 48/00,  
31/7105, A61P29/00, 37/06, 19/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7072, 31/335, 31/343, 48/00,  
31/7105, A61P29/00, 37/06, 19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	片山泰一ら, '小胞体ストレスとアポトーシス', 実験医学, 2001, 19(13):1695-1702	1, 2 3-7
Y	萩山裕之ら, '関節リウマチとアポトーシス', 医学のあゆみ, 2003.06.07, 205(10):763-767	4-7
Y	WO 02/052007 A1 (株式会社ロコモジェン) 2002.07.04, 第30頁8-16行 & EP 1352961 A1	7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.09.2004

国際調査報告の発送日

05.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kaneko M et al. 'Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation.' FEBS Lett. 2002 Dec 4; 532(1-2):147-52.	3, 7

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：



## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8, 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲8, 9は、治療による人体の処置方法を包含するものであり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## &lt;調査の対象について&gt;

(1) 請求の範囲1, 3, 4, 6, 7の、「小胞体ストレスを誘導する物質」は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分（具体的には、請求の範囲2, 5に記載されたツニカマイシン、タブシガルギン及びブレフェルディンA）にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

(2) 請求の範囲4, 5, 7の、「自己免疫疾患治療剤」には、あらゆる種類の自己免疫疾患に対する治療剤が含まれる。しかしながら、PCT第5条の意味において具体的に開示されているのは、請求の範囲6に記載された関節リウマチについてのみである。そして、本願明細書の開示が、特に滑膜細胞の増殖抑制に関するものであることを考慮すると、他の自己免疫疾患の治療については、明細書PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

したがって、調査は以下の範囲で行った。

(請求項1－3について)

- ・小胞体ストレス誘導とアポトーシス誘導の関係について
- ・請求項2に記載されたツニカマイシン、タブシガルギン及びブレフェルディンAを含むアポトーシス誘導剤について

(請求項4－7について)

- ・小胞体ストレス誘導と関節リウマチ治療の関係について
- ・請求項5に記載されたツニカマイシン、タブシガルギン及びブレフェルディンAを含む関節リウマチ治療剤について

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**